

PCTWORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁵ : C12P 21/100, 19/26, 19/18 C12N 9/10, C12M 1/40 A01N 43/04, 47/28, A61K 7/22 A23L 1/00	A1	(11) International Publication Number: WO 91/16449 (43) International Publication Date: 31 October 1991 (31.10.91)
(21) International Application Number: PCT/US91/02430 (22) International Filing Date: 11 April 1991 (11.04.91) (30) Priority data: 509,560 16 April 1990 (16.04.90) US not furnished 11 April 1991 (11.04.91) US (71) Applicant: THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA [US/US]; 133 South 36th Street, Suite 419, Philadelphia, PA 19104 (US). (72) Inventor: ROTH, Steve ; 1105 Rose Glen Road, Gladwyne, PA 19035 (US). (74) Agents: LAVALLEYE, Jean-Paul et al.; Oblon, Spivak, McClelland, Maier & Neustadt, Crystal Square Five - Fourth Floor, 1755 South Jefferson Davis Highway, Arlington, VA 22202 (US).		(81) Designated States: AT (European patent), AU, BB, BE (European patent), BF (OAPI patent), BG, BJ (OAPI patent), BR, CA, CF (OAPI patent), CG (OAPI patent), CH (European patent), CM (OAPI patent), DE (European patent), DK (European patent), ES (European patent), FI, FR (European patent), GA (OAPI patent), GB (European patent), GR (European patent), HU, IT (European patent), JP, KP, KR, LU (European patent), ML (OAPI patent), MR (OAPI patent), NL (European patent), NO, RO, SD, SE (European patent), SN (OAPI patent), SU, TD (OAPI patent), TG (OAPI patent). Published <i>With international search report.</i>
(54) Title: SACCHARIDE COMPOSITIONS, METHODS AND APPARATUS FOR THEIR SYNTHESIS (57) Abstract A method for preparing saccharide compositions is disclosed. The method is reiterative and comprises the following three steps: (i) a glycosyltransferase capable of transferring a preselected saccharide unit to an acceptor moiety is isolated by contacting the acceptor moiety with a mixture suspected of containing the glycosyltransferase under conditions effective to bind the acceptor moiety and the glycosyltransferase and thereby isolate the glycosyltransferase. The acceptor moiety is a protein, a glycoprotein, a lipid, a glycolipid, or a carbohydrate. (ii) The isolated glycosyltransferase is then used to catalyze the bond between the acceptor moiety and the preselected saccharide unit. (iii) Steps (i) and (ii) are repeated a plurality of times with the intermediate product obtained in the first iteration of the method being used as the acceptor moiety of the second iteration.		

⑫ 公表特許公報(A)

平5-500905

⑬ 公表 平成5年(1993)2月25日

⑭ Int. Cl.⁹ 識別記号 庁内整理番号 審査請求 未請求
 C 12 P 19/18 7432-4B 予備審査請求 未請求
 A 61 K 7/22 7252-4C
 31/70 A B E ※

部門(区分) 1(1)

(全 18 頁)

⑯ 発明の名称 サツカライド組成、その合成法と合成装置

⑰ 特 願 平3-507770

⑱ 出 願 平3(1991)4月11日

⑲ 翻訳文提出日 平3(1991)12月16日

⑳ 国際出願 PCT/US91/02430

㉑ 国際公開番号 WO91/16449

㉒ 国際公開日 平3(1991)10月31日

優先権主張 ㉓ 1990年4月16日 ㉔ 米国(U S) ㉕ 509,560

㉖ 発明者 ロス, ステイープ アメリカ合衆国、ペンシルバニア・19035、グラッドワイン、ローズ・グレン・ロード・1105

㉗ 出 願 人 ザ・トラステイズ・オブ・ アメリカ合衆国、ペンシルバニア・19104、フィラデルフィア、スザ・ユニバーシティー・オブ・ イート・419、サウス・サーティーシツクス・ストリート・133
 ペンシルバニア

㉘ 代理人 弁理士 川口 義雄 外4名

㉙ 指 定 国 A T (広域特許), A U, B B, B E (広域特許), B F (広域特許), B G, B J (広域特許), B R, C A, C F (広域特許), C G (広域特許), C H (広域特許), C M (広域特許), D E (広域特許), D K (広域特許), E S (広域特許), F I, F R (広域特許), G A (広域特許), G B (広域特許), G R (広域特許), H U, I T (広域特許), J P, K P, K R, L U (広域特許), M L (広域特許), M R (広域特許), N L (広域特許), N O, R O, S D, S E (広域特許), S N (広域特許), S U, T D (広域特許), T G (広域特許)

最終頁に続く

請 求 の 範 囲

1. あらかじめ選んだサツカライド・ユニットを、受容体部分に連続的に結合させることによる、グリコシルトランスフェラーゼ触媒による、サツカライド組成の調製法であって、次の諸段階から成る方法:

(1) あらかじめ選んだサツカライド・ユニットを受容体部分に移送することである、グリコシルトランスフェラーゼを、受容体部分と、複数のグリコシルトランスフェラーゼを含むと予想される混合物とを、上記受容体部分と上記グリコシルトランスフェラーゼの結合を実現させるような条件下で接触させ、それによって、上記グリコシルトランスフェラーゼを単離することによって調製し、ここに、上記受容体部分は、蛋白質類、糖蛋白質類、脂質類、糖脂質類、炭水化物類から選ばれた一つであり;

(11) 上記あらかじめ選んだサツカライド・ユニットを、上記グリコシルトランスフェラーゼ触媒の下で、上記受容体部分に結合させるのに十分な条件と共存試薬を供給し、これにより、ある産物を得;

(111) 段階(1)、(11)を複数回実施することで、それによって、任意の一回工程における段階(11)で得られた産物を、次回工程の段階(1)の受容体部分として使用し、これを、上記サツカライド組成が得られるまで繰り返す。

2. 請求項1の方法であって、上記炭水化物が、モノサツカライド類、ジサツカライド類、オリゴサツカライド類、及びポリサツカライド類から成るグループから選ばれた一つである方法。

3. 請求項1の方法であって、段階(11)で用いられるグリコシルトランスフェラーゼが、固相支持体に固定されている方法。

4. 請求項3の方法であって、固相支持体に付着された上記グリコシルトランスフェラーゼが、固定操作の間、上記グリコシルトランスフェラーゼの活性部位を保護することによって得られたものである方法。

5. 請求項1の方法であって、上記共存試薬が、マンガン陽イオンを含む方法。

6. 請求項1の方法であって、段階(11)で使用する上記サツカライドがサツカライド・ヌクレオチドである方法。

7. 請求項5の方法であって、上記ヌクレオチドが、ウリジン、グアノシン及びシチジン磷酸類から成るグループから選ばれた一つである方法。

8. 請求項1の方法であって、上記第一回工程で使用される上記受容体部分が、蛋白質類、糖蛋白質類、脂質類及び糖脂質類から成るグループから選ばれた一つである方法。

9. 請求項1の方法であって、上記第一回工程で使用される上記受容体部分が、モノサッカライド類、ジサッカライド類、オリゴサッカライド類及びポリサッカライド類から成るグループから選ばれた一つである方法。

10. 請求項1の方法であって、上記第一回工程で使用される上記受容体部分が、N-アセチルグルコサミンである方法。

11. 請求項1の方法であって、上記第一回工程で使用される上記受容体部分がN-アセチルグルコサミンであり、上記第一回工程で使用される上記グリコシルトランスフェラーゼがガラクトシル・トランスフェラーゼであり、上記第2回工程で使用される上記グリコシルトランスフェラーゼがN-アセチルニューラミン・トランスフェラーゼである方法。

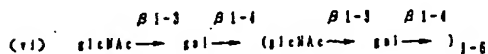
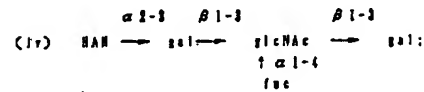
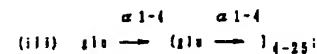
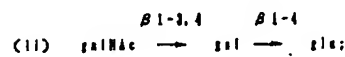
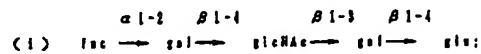
12. 請求項1の方法であって、上記第2回工程で使用され

る上記受容体部分が、ガラクトシル β 1-4 N-アセチルグルコサミンである方法。

13. 請求項1の方法であって、使用される供与体部分の少なくとも1つが、シチジン1磷酸N-アセチルニューラミン酸である方法。

14. 請求項1の方法であって、複数のグリコシルトランスフェラーゼを含むと予想される上記混合物が、細胞ホモジェネートである方法。

15. 請求項1の方法であって、上記サッカライド組成が、下記の式の一つで表わされる化合物である方法：



16. 医薬組成物であって、薬学的に受容できる付形利または搬送剤と共に、ヘパリン以外のサッカライド組成を含み、該サッカライド組成は、あらかじめ選ばれたサッカライド・ユニットを、受容体部分へ、グリコシルトランスフェラーゼ触媒の下、連続的に結合させる方法によって調製されるもので、その方法は、下記の諸段階から成る：

(I) あらかじめ選んだサッカライド・ユニットを受容体部分に移送することのできる、グリコシルトランスフェラーゼを、受容体部分と、複数のグリコシルトランスフェラーゼを含むと予想される混合物とを、上記受容体部分と上記グリコシルトランスフェラーゼの結合を促進させるような条件下で接触させ、それによって、上記グリコシルトランスフェラーゼを単離することによって調製し、ここに、上記受容体部分は、蛋白質類、糖蛋白質類、脂質類、糖脂質類、炭水化物類から選ばれた一つであり；

(II) 上記あらかじめ選んだサッカライド・ユニットを、上記グリコシルトランスフェラーゼ触媒の下で、上記受容体部分

に結合させるのに十分な条件と共存試薬を供給し、これにより、ある産物を得；

(III) 段階(I)、(II)を複数回実施することで、それによって、任意の一回工程における段階(II)で得られた産物を、次回工程の段階(I)の受容体部分として使用し、これを、上記サッカライド組成物が得られるまで繰り返す。

17. 請求項16の医薬組成物であって、少なくとも100%の上記サッカライド組成を含む組成物。

18. 請求項16の医薬組成物であって、少なくとも1%の上記サッカライド組成を含む組成物。

19. 請求項16の医薬組成物であって、上記第一回工程で使用される上記受容体部分が蛋白質である組成物。

20. 請求項16の医薬組成物であって、上記第一回工程で使用される上記受容体部分が糖蛋白質である組成物。

21. 請求項16の医薬組成物であって、上記第一回工程で使用される上記受容体部分が脂質である組成物。

22. 請求項16の医薬組成物であって、上記第一回工程で使用される上記受容体部分が糖脂質である組成物。

23. 請求項16の医薬組成物であって、上記第一回工程で

特表平5-500905 (3)

使用される上記受容体部分が炭水化物である組成物。

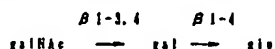
24. 請求項16の医薬組成物であって、上記第一回工程で使用される上記受容体部分がモノサッカライドである組成物。

25. 請求項16の医薬組成物であって、上記第一回工程で使用される上記受容体部分がジサッカライドである組成物。

26. 請求項16の医薬組成物であって、上記第一回工程で使用される上記受容体部分がオリゴサッカライドである組成物。

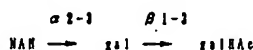
27. 請求項16の医薬組成物であって、上記第一回工程で使用される上記受容体部分がポリサッカライドである組成物。

28. 肺炎の療法ないし治療に用いるのにふさわしい医薬組成物であって、下記の式の化合物を有効量含む、



かつ、薬学的に受容できる搬送剤ないし付形剤を伴っている組成物。

29. 歯周病疾患の療法ないし治療に用いるのにふさわしい医薬組成物であって、下記の式の化合物を有効量含む、



によって調製されるもので、その方法は、下記の施設階から成る：

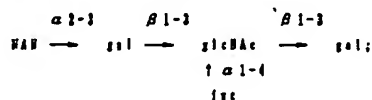
(1) あらかじめ選んだサッカライド・ユニットを受容体部分に移送することのできる、グリコシルトランスフェラーゼを、受容体部分と、複数のグリコシルトランスフェラーゼを含むと予想される混合物とを、上記受容体部分と上記グリコシルトランスフェラーゼの結合を実現させるような条件下で接触させ、それによって、上記グリコシルトランスフェラーゼを単離することによって調製し、ここに、上記受容体部分は、蛋白質類、糖蛋白質類、脂質類、糖脂質類、炭水化物類から選ばれた一つであり；

(11) 上記あらかじめ選んだサッカライド・ユニットを、上記グリコシルトランスフェラーゼ触媒の下で、上記受容体部分に結合させるのに十分な条件と共存試薬を供給し、これにより、ある産物を得；

(111) 段階(1)、(11)を複数回実施することで、それによって、任意の一回工程における段階(11)で得られた産物を、次回工程の段階(1)の受容体部分として使用し、これを、上記サッカライド組成物が得られるまで繰り返す。

かつ、薬学的に受容できる搬送剤ないし付形剤を伴っている組成物。

30. 硬結性腫瘍の療法ないし治療に用いるのにふさわしい医薬組成物であって、下記の式の化合物を有効量含む、



かつ、製薬的に受容できる搬送剤ないし付形剤を伴っている組成物。

31. 癌転移として用いるのにふさわしい医薬組成物であって、下記の式の化合物を有効量含む、



かつ、薬学的に受容できる搬送剤ないし付形剤を伴っている組成物。

32. トラガカント・ゴムまたはカラグナン以外の、サッカライド組成を含む食品であって、該サッカライド組成は、あらかじめ選んだサッカライド・ユニットを、受容体部分へ、グリコシルトランスフェラーゼ触媒の下、連続的に結合させる方法

33. 幼児食品において、0.1 μg/gから 10 μg/gの量の次式の化合物を含む改良である該食品。



34. サッカライド組成の、グリコシルトランスフェラーゼ触媒による合成のための装置であって、

反応器；

上記反応器における少なくとも4つの異なるグリコシルトランスフェラーゼ；

入口機構であって、受容体部分と、複数のあらかじめ選ばれたサッカライド・ユニットを、上記サッカライド組成が合成されるように上記反応器に導入するためのもの；

出口機構であって、上記サッカライド組成を上記反応器から放出するためのもの；

から成り、ここに、上記受容体部分は、蛋白質類、糖蛋白質類、脂質類、糖脂質類及び炭水化物類から成るグループから選ばれた、一つである前記装置。

35. 請求項34の装置であって、上記反応器が、相互に連続的に流体連絡を形成するように、連続的に接続された複数の

反応層から成り、ここに、各反応層は、あらかじめ選んだサッカライド・ユニットを、前段反応層で形成された中間産物に結合させるのに特異的な触媒として働くグリコシルトランスフェラーゼを含む装置。

36. 請求項34の装置であって、上記反応層の各々において形成された中間産物を、そこで生成された他の反応混合物より精製する手段が、流体連絡内で、上記反応層それぞれの間にある装置。

37. 請求項34の装置であって、上記グリコシルトランスフェラーゼが固相支持体上に固定されている装置。

38. 請求項37の装置であって、上記固相支持体の上に固定された上記グリコシルトランスフェラーゼの活性部位が、固定操作の間保護されている装置。

ポリサッカライドは、従来、もっとも研究の不足しているところであった。これは、かなりの部分が、その、時として複雑な糖鎖の配列を決めたり、合成するのが困難であったためである。オリゴサッカライドとポリサッカライドの合成は十分な発達を見てはいるけれども、オリゴサッカライド合成に関しては、一般に適応可能な方法と言うものは現在ない。

炭水化物の合成に関しては、古典的な方法が多数開発されているけれども、これらの方法は、選択的保護や除蛋白を必要とするという厄介を免れない。さらに、オリゴサッカライドの有機合成は、グリコシド結合の脆弱であること、領域選択的糖結合を實現することが困難であること、一般に合成収率が低いこと、によって妨げられている。上記困難は、炭水化物を精製し、その構造解析するのに伴う困難と相俟って、この分野の化学にたいする研究の不足を一層際立たせるものとなっている。

従来、研究努力の多くが、炭水化物や、炭水化物フラグメントから成る分子、例えば、糖脂質、糖蛋白に向けられて来た。このような部分にたいする研究の興味は、蛋白と炭水化物間の相互作用は、広範な生物認識現象に関わるという意識から来ている。この生物認識現象には、授精、分子標的、細胞

技術分野

本発明は、サッカライド組成、例えば、オリゴサッカライド、ポリサッカライド、糖脂質、糖蛋白に関わる。さらに具体的に言うと、本発明は、上記および、上記以外のサッカライド組成を、群衆法によって調製する工程に関わる。

背景技術

「炭水化物」という用語は、一般式 $(C_nH_{2n}O)_n$ を持つ様々な化合物、例えば、ジサッカライド、オリゴサッカライド、ポリサッカライドを内包する。オリゴサッカライドは、サッカライド・ユニットから成る結合鎖であって、サッカライド・ユニットは、別名、糖とも言われる。このサッカライド・ユニットは、どのような順序にも配列することができ、また、2個のサッカライド間の結合は、約10通りの異なるやり方のいずれのものにでもなることができる。この結果、異なる、可能な、立体異性体オリゴサッカライド鎖の数は膨大になる。

あらゆる生物学的ポリマー系の中でも、オリゴサッカライドと

間認識、ウィルス性、細胞性、真菌性病原性がある。現在広く認められていることであるが、糖蛋白や糖脂質のオリゴサッカライド部分が、細胞と細胞、細胞とリガンド、細胞と細胞外基質、細胞と病原体、との間の認識を仲介する。

上記認識現象は、細胞認識に関わる糖蛋白ないし糖脂質の活性部分に認められるものと同じ糖配列、立体化学を持つオリゴサッカライドによって抑制されることがあるらしい。オリゴサッカライドは、受容体蛋白上の結合部位を争って、糖蛋白や糖脂質と競合すると考えられている。例えば、ジサッカライド・ガラクトシルβ 1-4 N-アセチルグルコサミンは、生細胞、細胞膜の受容体と相互作用を持つ糖蛋白の1成分と考えられている。したがって、もしかしたら有毒であるかもしれない部分と、細胞の結合部位を競合するという点において、オリゴサッカライドおよびその他のサッカライド組成は、薬学、診断学、治療法に新分野を開く可能性を持つ。

オリゴサッカライドを、ヒトおよび動物の病気の治療薬としてテストすることについては、比較的僅かな努力しかなされていない。これは、先にも述べた通り、オリゴサッカライドの合成法がられなかったためである。限られた種類の、小さなオ

リゴサッカライドについては、有機化学的方法によって、特注合成もできようが、そのような化合物の製造コストは、通常、きわめて高い。おまけに、オリゴサッカライドを立体特異的に合成することはきわめて困難であり、ある種の糖、例えば、シアル酸やフコースを付加することは、その結合が極端に脆弱であるために、従来有効に実現することはできなかった。オリゴサッカライドにたいする、一般的に適用できる改良法が求められている。これは、薬学、治療用の各種のオリゴサッカライドを大量に生産するためである。

ある種の応用においては、従来法に代わるものとして、有機合成における酵素の使用に道を定めている。例えば、有機合成においては、酵素は、触媒として用いられてきている。反応速度加速や立体選択性といった分野においては、合成酵素反応の低価は実証済みである。さらに、ある種の酵素の低コスト生産や、その性質の変更については、現在既に、技術がある。

炭水化物合成の触媒として、酵素を使用することは、従来から提案されてきてはいるが、今日まで、オリゴサッカライドやその他の複雑な炭水化物を、相当量、一般合成するのに有効な酵素法はまだ見つかっていない。一般に認められていることで

あるが、炭水化物合成に酵素を触媒として使用するにあたって、主な制限因子となるのは、炭水化物合成を実現するのに必要な広範な酵素の入手が、現在、きわめて限られていることである。Fount et al., *Tetrahedron Reports* (1990) (45) 17:5355-5422 を参照されたい。

ほ乳類系においては、ヌクレオシド・モノ、ジ磷酸の形で活性化される8種のモノサッカライドが、多くのオリゴサッカライドを構成する要素となる。すなわち、UDP-Glc, UDP-GlcUA, UDP-GlcNAc, UDP-Gal, UDP-GalNAc, GGP-Man, GDP-Fuc, 及び CMP-HexAc である。これらは、*Leilei* 経路の中間代謝物である。もっと多数の糖（例えば、キシロースやアラビノース）や、オリゴサッカライドが、微生物や植物にはある。

2 群の酵素が、オリゴサッカライドのインビロ合成に関連する。*Leilei* 経路の酵素は最大のグループである。この酵素は、糖ヌクレオシド磷酸として活性化された糖を、成長するオリゴサッカライド鎖に移送する。非 *Leilei* 経路酵素は、糖磷酸として活性化された炭水化物ユニットは移送するが、糖ヌクレオシド磷酸として活性化されたものは移送しない。

オリゴサッカライドの、インビトロ、酵素触媒合成について

は、従来二つの方法が提案されている。Fount et al., 上記参照。第一の方法は、グリコシルトランスフェラーゼの使用である。第二のものは、グリコシダーゼまたはグリコシル・ヒドロラーゼを使用する。

グリコシルトランスフェラーゼは、活性化された糖を、蛋白ないし脂質に、または、成長するオリゴサッカライドの非還元性末端に、段階的に付加するよう触媒する。炭水化物を合成するには、多数のグリコシルトランスフェラーゼが必要のようである。各 HDP-糖残基は、一定系のグリコシルトランスフェラーゼを必要とし、今日までに特定されている百個以上のグリコシルトランスフェラーゼのそれぞれが、ある特定のグリコシド結合の形成を触媒するようである。現在までのところ、グリコシルトランスフェラーゼの特異性の正確な詳細は不明である。例えば、炭水化物のどの配列が、上記酵素の多くによって認識されるのかも不明である。

Leilei 経路の酵素は、オリゴサッカライドの合成に応用を見いだしてきている。このような方法がうまくいくためには、二つの要素が必要である。糖ヌクレオシド磷酸が、実用コストで入手できなければならない。また、グリコシルトランスフェラ

ーゼが入手できなければならない。最初の問題は、ほ乳類系合成に必要なものを含めて、通常の HDP-糖に関しては解決済みである。しかしながら、本法の問題点は第二の問題にある。これまでのところ、ごくわずかな数のグリコシルトランスフェラーゼしか入手されない。この種の酵素の入手可能性が、この種の炭水化物合成法の唯一の制限因子となっている。

従来から報告されていることであるが、多くのグリコシルトランスフェラーゼは、単離が困難である。特に、ほ乳類由来のものはそうである。これは、この蛋白が、低濃度で、かつ、膜に結合しているからである。さらに、少数のグリコシルトランスフェラーゼは固定することができるけれども、この酵素は不安定だという報告がある。これまでのところ、ごく少数のグリコシルトランスフェラーゼしか、市販されておらず、しかも、その原料は高価である。

したがって、酵素の遺伝子工学（すなわち、クローニング）の将来の発展には多大の期待が寄せられていた。これは、特に、ガラクト、フコシル、シアリルの各トランスフェラーゼを含む、いくつかのグリコシルトランスフェラーゼがクローニングされるようになって以来、そうであった。クローニング技術の将来

の進捗によって、他のグリコシルトランスフェラーゼのクローニングが促進され、その安定性が強化されることが期待される。

したがって、その潜在的な有用性、および、それらを十分な量入手することが困難であること、または、不可能であること、から見て、次のような一般的な合成法にたいしては、長年に渡る要求があった。すなわち、オリゴサッカライド、ポリサッカライド、糖蛋白、糖脂質、同原物を、効率的で、コスト当りの有効性の高い、立体特異的で、一般的に応用可能なやり方で、生産する方法である。

発明の開示

サッカライド組成、特にオリゴサッカライド、ポリサッカライド、および、オリゴサッカライド・ユニットを含む化学的部分を与えるのが、本発明の目的である。

天然に見られないものを含めて、広範なサッカライド組成を与えるのが、本発明のもう一つの目的である。

ヒトないし動物の病気の作用を緩和するのに有効なサッカライド組成を与えるのが本発明のもう一つの目的である。

さらに、サッカライド組成を調製するための改良法を与えるのが、本発明のもう一つの目的である。

的であり、かつ、サッカライド・ユニットを受容体部分に移送することができるように調製する。本発明の、この方法は複数回実行されるが、それは、第1回反応の生成物が、第2回反応の受容体部分となる、これが次々に繰り返されるというように実行される。

図面の簡単な説明

第1、2、3図は、本発明に従って、グリコシルトランスフェラーゼ触媒によるサッカライド組成の合成に好適な装置を図示したものである。

第1図。(1) 酵素1

本発明を実施する最良形態

本明細書中、「サッカライド組成」とは、その構造の中に、1個のサッカライド・ユニットを持つ、いかなる化学的部分をも含むことを意図したものである。糖類、炭水化物類、サッカライド類、モノサッカライド類、オリゴサッカライド類、ポリサッカライド類、糖蛋白類、糖脂質類は、サッカライド組成の例である。そのような部分を含む混合物や溶液も、サッカライド組成である。

サッカライド組成は、本発明に従って、供与体部分由来のサ

サッカライド組成を調製するための酵素法を与えるのが、本発明のもう一つの目的である。

さらに、サッカライド組成を合成するのに有効な酵素の入手法を与えるのが、本発明のもう一つの目的である。

さらに、本発明に従って、サッカライド組成を合成するのに有効な装置を与えるのが、本発明のもう一つの目的である。

上記および他の目的が本発明によって達成される。すなわち、本発明は、オリゴサッカライド、ポリサッカライド、糖脂質、糖蛋白、その他のサッカライド組成の、酵素調製法を与える。この方法では、供与体部分から、あらかじめ選んだサッカライド・ユニットを、受容体部分へ、酵素促進性の移送を行なう。複数回のサッカライド・ユニットを持つサッカライド組成は、できれば、そのサッカライド・ユニットを、受容体部分に、段階的に付加して調製したものが望ましい。この受容体部分は、それ自らが、本発明に従って調製されたサッカライド組成である。

したがって、サッカライド組成を調製する方法が与えられるが、この方法は、受容体部分を与え、その受容体部分を、グリコシルトランスフェラーゼに接触させるという段階を含む。グリコシルトランスフェラーゼは、その受容体部分にたいし特異

サッカライドを、受容体部分に、酵素による促進の下に移送して、調製される。このような移送は、受容体、供与体部分を、あるグリコシルトランスフェラーゼを接触させると起こり、通常、受容体部分と、サッカライド・ユニットとの共有結合に終わること、すなわち、ただ一個の立体異性体の生成をもたらすことは、了解されるであろう。

本発明に従って調製されたサッカライド組成は、診断、治療、薬理的应用に広い有効性を持つと考えられる。所望の標的サッカライド組成の調配列が、通常の方法で一旦決定された場合、そのサッカライド組成にたいする適当な合成法を決めるには、一般に、レトロ合成解析を実行する。このような合成法では、できれば、その所望のサッカライド組成を生成するのに必要な、特定の供与体部分、受容体部分、グリコシルトランスフェラーゼを、特定することが望ましい。

炭水化物合成に必要な多数のグリコシルトランスフェラーゼを得るのに、遺伝子工学の将来の発達を待つのでなしに、本発明は、下記のように、まったく別の方法に依存する。本発明に従って、サッカライド組成を合成する場合には、あらかじめ選んだサッカライド・ユニット(単糖)を、先ず、酵素的に、

最初の受容体部分に付着させる。すなわち、蛋白、糖蛋白、脂質、糖脂質、または、炭水化物による開始物質に付着させる。その次に、あらかじめ選んだサッカライド・ユニット（複数）を、このようにして得られた生成物に、段階的に、酵素的に付着させる。このようにして、サッカライド組成を形成する。

あらかじめ選んだサッカライド・ユニットの各々を付着させるごとに、中間産物を得ることになる。

本発明は、発明者の次の発見に基づく。すなわち、本合成の開始物質（すなわち、蛋白、糖蛋白、脂質、糖脂質、または、炭水化物）と、本合成において形成される各中間産物は、本合成の相当する各段階ごとに、標的サッカライド組成の合成における次の中間産物の付着を触媒するのに特異的なグリコシルトランスフェラーゼを入手するのに、有利に用いることができるという発見である。

したがって、本発明に従えば、ある段階に必要なグリコシルトランスフェラーゼは、その中間産物（受容体部分）によって単離され、標的炭水化物分子を構築するのに必要な、次のサッカライド・ユニットを、その受容体部分に付着するのに用いることができる。本発明によれば、この操作を繰り返し、かつ、

トを受容体部分に移送することのできる、グリコシルトランスフェラーゼを調製する手段を提供する。この方法は、受容体部分を、複数のグリコシルトランスフェラーゼを含むと予想される混合物と、受容体部分とその受容体部分にたいして特異的なグリコシルトランスフェラーゼを結合させるのに有効な条件下で、接触させることである。次に、その結果生じた結合グリコシルトランスフェラーゼを単離する。このグリコシルトランスフェラーゼの配列を決定すること、このグリコシルトランスフェラーゼを、遺伝子工学法によって、多量に製造すること、が望ましい。

目的のグリコシルトランスフェラーゼを含むと予想される混合物は、下記のようにして特定することができる。ごくありふれたグリコシド結合については、そのグリコシルトランスフェラーゼ活性は、出版物に記載されている。これは、ミルクのオリゴサッカライド、あるいは、典型的な（すなわち、広く普及している）糖蛋白や糖脂質の炭水化物部分にたいしては、ほとんど当てはまる。それよりずっと記載の少ない結合については、その結合の見られる組織、器官、食物微生物をまず見るのがよい。一般に、結合がある特定の供給源に見られる場合、その結

繰り返し（回数）の度ごとに、次のサッカライド・ユニットを、単離すべき、成長する分子に付着するのに必要な特定のグリコシルトランスフェラーゼを生成し、標的炭水化物分子が得られるまで続ける。

さらに、本発明によって与えられるものは、このサッカライド・ユニットを、この受容体部分に共有結合させるのに必要・十分であると思われる反応条件と共存試薬である。

好ましい実施例に従えば、受容体部分は、蛋白、糖蛋白、脂質、糖脂質、または、モノサッカライド、ジサッカライド、オリゴサッカライドないしポリサッカライドのような炭水化物でもよい。その他の好ましい実施例に従えば、グリコシルトランスフェラーゼは、固相の支持体に付着させられる。

本法によって、サッカライド・ユニットは、受容体部分に立体特異的に付着させられる。一般に、供与体部分としては、サッカライドヌクレオチドを用いるのが望ましい。供与されるべきサッカライド・ユニットを末端に持つウリジン、グアノシン、シチデン核酸物質が、供与体部分を構成するのが好ましい。

したがって、本発明はまた、特定の受容体部分にたいして特異的であり、かつ、あらかじめ選ばれたサッカライド・ユニッ

合を形成した酵素もその供給源の中に存在する。

もし、サッカライド構造だけが与えられており、供給源が与えられていない場合には、そのようなサッカライド構造を含むと思われる生物例を、利用可能なものの内、もっとも感度の高いスクリーニング法でテストすることができる。例えば、その化合物が、イズロン酸、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミンを含んでいるならば、脊椎動物の結合組織をテストするのがよいだろう。もし標的化合物がアベコースを含んでいるならば、細菌や植物をテストして、相応するグリコシルトランスフェラーゼがあるかどうかを見るのがよいだろう。

本発明に一致して用いることのできるグリコシルトランスフェラーゼ検出法は種々のものが発表されている。下記のものは例示にすぎない。Parakev *et al*, *Biochem. J.*, (1985) 227:573-582は、ほう酸浸透紙による電気泳動法と、本発明者によって開発された蛍光法（第6図）について記載している。Roll *et al*, *Exp'l Cell Research* (1983) 142:217-235は、ほう酸法の、グルコシルトランスフェラーゼにたいする応用例について記載している。これは、以前は、比色分析によって測定していたものである。Rosen *et al*, *J. Biochem. Cytochem.*

(1990) 33(1):23-30は、デアソニウム塩の H₂O₂ による還元反応に基づく組織化学的測定法を記載している。

目的のグリコシルトランスフェラーゼの供 原が発見されたならば、その供給源をホモジェナイズする。受容体部分を親和性リガンドとして、アフィニティー・クロマトグラフィーにより、ホモジェネートから、その酵素を精製する。すなわち、その上に受容体部分を固定した固相基質の上に、そのホモジェネートを、グリコシルトランスフェラーゼを受容体部分に結合させるような条件下で、通過させる。次に、その上に、グリコシルトランスフェラーゼを結合させた、固相支持体を洗浄する。次に来るのが溶出段階であって、ここで、グリコシルトランスフェラーゼを固相から脱着し、収集する。よく知られているように、吸収されたグリコシルトランスフェラーゼは、例えば、塩の水溶液（例えば、HCl）を固相支持体の上に通過させることによって、溶出することができる。

本発明の実施において、ホモジェネートからアフィニティー・クロマトグラフィーによって精製され、受容体部分上で、あらかじめ選択されたサッカライド・ユニットを攻撃するのに用いられる「酵素」は、各種グリコシルトランスフェラーゼの混

合体から成る。そして、このグリコシルトランスフェラーゼは、精製グリコシルトランスフェラーゼの所望の活性を帯びることのできる酵素を含むホモジェネート中の、他の、外来性生物物質からあらかじめ精製したものである。したがって、本発明に従って使用されるグリコシルトランスフェラーゼは、各種「グリコシルトランスフェラーゼ」の混合物であることが多い。もし望ましくば、この原料を、さらに精製し、単一の精製グリコシルトランスフェラーゼを単離し、本発明の操作に用いてもよい。しかし、一般に、それ以上の精製は不要である。

本発明においては、あらかじめ選ばれたサッカライド・ユニットに共有的に結合できる、受容体部分が与えられる。代表的な受容体部分としては、蛋白質、糖蛋白質、脂質、糖脂質、炭水化物類がある。受容体部分は、それが、目的のサッカライド組成の構成成分として存在していればいほど、望ましいと言うことは了解されるであろう。例えば、N-アセチルグルコサミン α 1-3ガラクトシル β 1-4 N-アセチルグルコサミンのようなサッカライド組成を調製する場合には、好ましい受容体部分は、N-アセチルグルコサミンと、ガラクトシル β 1-4 N-アセチルグルコサミンであろう。同様に、ある受

容部分の末端がサッカライド・ユニットである場合、それに続くサッカライド・ユニットは、通常、その末端サッカライドの非還元性末端部に共有的に結合することも了解されるであろう。

受容体部分に移送されるべきサッカライド・ユニットは、そのサッカライド・ユニットにたいする供与体部分によって与えられる。本発明によれば、供与体部分は、移送されるべきサッカライド・ユニットを含み、かつ、そのサッカライド・ユニットを、受容体部分と相応のグリコシルトランスフェラーゼに接触させられた時に、その受容体部分に与えることができる。好ましい供与体部分は、サッカライド末端のウリジン核酸、サッカライド末端のデアノシン核酸、サッカライド末端のシチデン核酸のようなサッカライド・ヌクレオチド類である。

供与体部分は、受容体部分およびグリコシルトランスフェラーゼと接触した時に、直ちに、そのサッカライド成分を与えることができるのが好ましいことは了解されるであろう。例えば、ウリジン2核酸ガラクトースは、ガラクトースをN-アセチルグルコサミンに移送するので好ましく、シチリン1核酸N-アセチルニューラミン酸は、シアル酸の一種である、N-アセチルニューラミン酸を、ガラクトシル β 1-4 N-アセチルグ

ルコサミンに移送するので、好ましい。

あるサッカライド組成の調製に必要な受容体部分、供与体部分を選定したならば、各受容・供与ペアにたいし1つのグリコシルトランスフェラーゼを調製しなければならない。本技術に習熟した人ならば、グリコシルトランスフェラーゼとは、1サッカライド・ユニットが、ある化学的部分（ここでは供与体と定義する）から、もう一つ別のもの（ここでは、受容体と定義する）へと移送されるのを促進する酵素と、広く定義づけることができ、かつ、その移送するサッカライド・ユニットに従って、現象学的に命名されていることを了解しているであろう。それ故、ガラクトシル・トランスフェラーゼは、ガラクトースを移送するのであり、フコシル・トランスフェラーゼは、フコースを移送する。

本発明によるグリコシルトランスフェラーゼとは、あらかじめ定められたサッカライド・ユニットを、受容体部分へ移送することのできるものである。グリコシルトランスフェラーゼは、できれば、受容体部分か、少なくとも、その、顕著な、活性又は、基質部分にたいして、特異的であることが望ましい。あるグリコシルトランスフェラーゼにおける 異性とは、ある受容

体部分と接触ないし近接させた時に、その特定配列部分と結合を結びやすく、かつ、ある特定のサッカライド・ユニットを、その受容体部分へ移送させやすい、そのような性向として発揮される。

現在、グリコシルトランスフェラーゼは、天然供給源からのものがあるだけであって、そのため、やや数が少ない。既知のグリコシルトランスフェラーゼは、きわめて特異的なサッカライド・ユニット移送しか実現できないことは、了解されるであろう。きわめて特異的というのは、移送されるサッカライド・ユニットの化学的性質から言っても、それが、その後、受容体部分に付着したときの立体化学から言ってもそうである。例えば、1個のN-アセチルニューラミニル・トランスフェラーゼは、N-アセチルニューラミン酸を、ただ1個のガラクトースを含む受容体部分に移送して、そのN-アセチルニューラミン酸ユニットと、そのガラクトース・ユニットとの間に α 1-3結合を持つサッカライド組成を生成する。

このようにして、本発明は、天然に見られる糖結合の機構を可能にする。例えば、ガラクトース α 1-3のN-アセチルニューラミン酸にたいする結合は、天然に見ることはできず、現

在実現できていない。しかしながら、ここに開示した方法は、入手可能な、いかなる種類のグリコシルトランスフェラーゼにたいしても応用可能である。

いくつかのグリコシルトランスフェラーゼについては、その振舞いは知られているとはいっても、多くのグリコシルトランスフェラーゼについては、現在のところ十分にその性質が明らかにされていない。しかしながら、本発明は、本発明の実行によさしい全てのグリコシルトランスフェラーゼを特定し、調製することのできる方法を与える。受容体部分を、アフィニティー・クロマトグラフィーの手段として用い、特定のサッカライド・ユニットを移送することのできる、したがって、他のグリコシドを合成することのできる、酵素を単離できるということは現在分かっている。

ある好ましい実施例においては、受容体部分を、例えば、固相の支持体に固定する。この、「固相の支持体」とは、半固形の支持体をも含むことは了解されるであろう。一旦固定させたなら、その受容体部分を、グリコシルトランスフェラーゼを含むと予想される混合物、例えば、天然の細胞ホモジェネートに接触させる。固定された受容体部分は、それにたいして特異的

な酵素と結合するから、次に、このシステムについて、受容体結合酵素の有無を監視する。

受容体結合酵素の有無の監視は、次のようにして実施できる。細胞ホモジェネートを、固定化した受容体部分の上を通過させる。これは、例えば、細胞ホモジェネートを、固定化した受容体部分を負荷したカラム上を通過させることによって実行することができる。次に、カラムを洗浄し、固定化した受容体部分で負荷したカラムを通過する蛋白量を測定する。これ以上蛋白が検出されなくなったら、塩の水溶液である溶出液をカラムに流し、酵素を溶出する。かくして得られた溶出液について、グリコシルトランスフェラーゼ（単数または複数）の有無を測定する。用いることのできる測定法については、前述した。すなわち、Furukawa *et al.*, *Cell* 41, 1981, および, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 の記載する方法である。

受容体部分にたいする酵素の結合が見られない場合には（すなわち、溶出液の測定によっても、その中に、グリコシルトランスフェラーゼ（単数または複数）の存在が認められなければ）、その混合物には、その特定の受容体にたいして特異的な酵素は含まれていない、と結論することができる。次に、他の、例

えば、動物、および、または植物細胞ホモジェネートの混合物を、その受容体部分と接触させる。この操作を、酵素結合が見つかるまで続ける。

受容体部分に酵素が結合している場合には、その種を分離し、さらに調べる。好ましい実施例においては、この受容体と、この酵素候補とを再び接触させるが、今度は、受容体部分に移送すべきサッカライド・ユニットを含む供与体部分の存在下に行なう。もしこの接触によって、サッカライドが受容体に移送されるならば、その酵素は、本発明の実施に有効なグリコシルトランスフェラーゼである。

一旦、このグリコシルトランスフェラーゼが特定されたならば、本技術に習熟した人々によく知られている技術を用いて、配列決定をし、かつ、または、複製することのできるものは了解されるであろう。例えば、複製は、そのグリコシル・トランスフェラーゼをコードする遺伝子原料の単離、および、そのグリコシルトランスフェラーゼを生成できる無限増殖性細胞系統の調製、を含む組換え技術によって実現することができるであろう。複製は、本発明によるサッカライド組成の商業規模の生産にとってはおそらく好ましいであろう。

このグリコシルトランスフェラーゼが特定されたなら、それを、受容体部分および供与体部分に、次の条件下に接触させる。すなわち、サッカライド・ユニットを受容体部分に移送し、共有的に結合させることができるような条件である。ある特定のサッカライド・ユニット移送に相応する、好適な条件、例えば、時間、温度、pHは、この分野の技術の一つを用い、通常の実験手法によって決めることができるのは了解されるであろう。例えば、受容、供与体部分は、2価陽イオン、特に、 $MgCl_2$ によって供給されるようなマンガン陽イオンの存在下で接触させるのが望ましい。

好ましい実施例においては、このグリコシルトランスフェラーゼを、固相の支持体に付着させることによって固定し、それによりして接触させるべき受容、供与体部分を、その上加えるのが望ましい。前述したように、本発明に従って用いられるグリコシルトランスフェラーゼは、所期の活性を持つ、少なくとも1個のグリコシルトランスフェラーゼを含むグリコシルトランスフェラーゼ類の混合物であることが多いが、精製した単一グリコシルトランスフェラーゼの使用もまた本発明に一致する。この好ましい実施例においては、グリコシルトランスフェ

る。

ある好ましい実施例として、そのグリコシルトランスフェラーゼを含む、中等度に精製した組成から、そのグリコシルトランスフェラーゼを固定してもよい。極めて酵素純度の高い標本（すなわち、1分間のインキュベーションにたいし、 $1\mu g$ の蛋白当たり移送されるものを1 $\mu mole$ で表わした比活性で見てそういうのである）ほど、固相の支持体に共有的に固定するには効率が悪い。これは、10倍から100倍程度の低い標本に比べると、誘導パーセントが低いという意味で言うのであるが。

グリコシルトランスフェラーゼの活性部分の、固定による損傷は避けるべきである、というのは了解されるであろう。本発明者は、次の観察をしている。すなわち、グリコシルトランスフェラーゼを、固定操作の間、特異的に保護すると、問題のグリコシルトランスフェラーゼに比べて、固定操作の間の汚染性酵素活性が消失する傾向があることである。固定操作の間、グリコシルトランスフェラーゼを、その酵素の必要とする陽イオン、その酵素によって認識されるヌクレオチド、および、その酵素によって認識される受容体によって保護してもよい。例えば、ガラクトシルトランスフェラーゼは、固定の間、 Mn^{2+} 、

ラーゼ類の混合物か、または、精製した単一グリコシルトランスフェラーゼのどちらでも固定してよい。また別のやり方として、そのグリコシルトランスフェラーゼ、供与体、受容体を、それぞれ溶液として供給し、溶質として接触させてもよい。

グリコシルトランスフェラーゼ類、そして、必要なら、受容体部分を固定するための好ましい操作は、 $poly(acrylamide-co-N-acryloyloxysuccinimide)$ (PAN)のような水性ポリマー前駆体、トリエチレンテトラミンのような架橋結合性ジアミン、および、当該グリコシルトランスフェラーゼを、中性バッファー中で、共重合させることである。これについては、Pollack et al., J. Am. Chem. Soc. (1980) 102:6324-26に開示してある通りである。PANにこの酵素類を固定するのは、少量の酵素を使うだけで、高い酵素活性を得ることができ、かつ、酵素とポリマー間の結合が安定であるという理由で有効である。

さらに、好ましい固定法は、グリコシルトランスフェラーゼのアミノ基を、固相支持体のオキシレニル基か（例えば、Chen et al., Enzyme Eng. (1980) 5:457-460を参照）、臭化シアニル基で「セファデックス」または「セファローズ」(Asen et al., Nature (1967) 214:1302-1304)上に固定することであ

N-アセチルグルコサミン、UDP によって保護してもよい。これは、いずれの移送法であっても用いてよい。汚染性の蛋白分解酵素は、このようには、固定操作の間、全く保護されない。

固定操作の間、所期のグリコシルトランスフェラーゼのみが保護されるので、標的サッカライド組成の合成を邪魔する酵素や、標的サッカライド組成の合成を邪魔する酵素活性は消失する傾向にある。干渉性酵素の例は、蛋白分解酵素があるが、これは、もし消失していなければ、所期のグリコシルトランスフェラーゼに作用するし、また、グリコシダーゼがあるが、これは、もし消失していなければ、サッカライド製品に作用する。

前述したように、本発明に基づいて、受容体部分を、供与体部分とグリコシルトランスフェラーゼに接触させて調製したサッカライドは、今度は、自らが、さらに酵素を単離するための受容体部分の、また、後続のサッカライド・ユニットが移送される受容体部分の、役目を果たす。このような接触によって、サッカライド組成にサッカライド・ユニットを付加するのは、炭水化物や、約3サッカライド・ユニットを超えるサッカライド類の合成にとっては望ましい。

例えば、トリサッカライドN-アセチルニューラミニル α

1-3 ガラクトシル β 1-4 N-アセチルグルコサミンを調製する場合には、ジサッカライド・ガラクトシル β 1-4N-アセチルグルコサミンを、本発明にしたがって調製し、次に、これを、受容体部分として用い、それに、後続のユニットを付加する。本技術に習熟した人であれば、本発明のサッカライド組成に付加されるサッカライド・ユニットは、同じものでも、別物でもよいことが了解されるであろう。

本発明のサッカライド・ユニットは、極めて広範囲の応用分野に使用され、既知の供給源から入手されるサッカライド組成と同様に使用できる。このサッカライド組成は、ほ乳類の治療処置、予防処置として用いるのが好ましい。これについては、0.1. 出願 01/241, 012 に開示した通りである。

本発明のサッカライド組成は、細胞表面受容体の阻止剤として、ウィルス性、細菌性、真菌性の多数の病気治療に使用を見込まれている。その病気には、例えば、肺炎、カンジダ症、尿路感染、歯周膜炎、下痢がある。例えば、本発明にしたがって調製されたオリゴサッカライドは、肺炎菌のような病原体が、ほ乳類分子に付着するのを抑制することができる。そのような病原体を、クロマトグラフィーや、電気泳動によって分離し

た細胞糖蛋白や糖脂質とインキュベートしてもよいだろう。特定の付着パターンを検出したら、その標的化合物を分析し、抑制性サッカライド化合物を調製することができるだろう。もし、その相補的分子のいずれかが、そのサッカライド成分を介して機能しているのであれば、特定のサッカライド組成が、付着を抑制するはずである。

本発明によって調製されるサッカライド組成は、下記の応用分野に使用することができる。

1. 栄養添加物

* 幼児用処方

(例えば、 $\text{Isc} \xrightarrow{\alpha 1-3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1-4} \text{GlcNAc} \xrightarrow{\beta 1-3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1-4} \text{Isc}$)

* 老人用処方

* 特別ケア処方

2. 抗菌剤

* 肺炎 (例えば、 $\text{GlcNAc} \xrightarrow{\beta 1-3/4} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1-4} \text{Isc}$)

* 尿路感染

(例えば、 $\text{Isc} \xrightarrow{\alpha 1-3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1-4} \text{GlcNAc} \xrightarrow{\beta 1-3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1-4} \text{Isc}$)

* 虫 歯

(例えば、 $\text{Gal} \xrightarrow{\alpha 1-4} \text{Gal} \xrightarrow{\alpha 1-4} \text{Gal}$) (1-25)

* 泡状およびゼリー状成分

7. 抗ウィルス剤

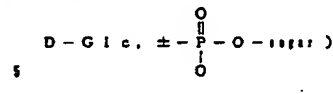
* ヘルペス

* インフルエンザ

* HIV

8. 抗真菌剤および抗酵母剤

* 経口および腫性カンジダ症 (例えば、グルコマンナン複合体、L-THAM, D-Gal 含有、 α -D-WAH (1-6) 分枝 α -(1-2)



* アクチノミセテス

9. 食品添加物

(例えば、トラガント・ゴム、 α -D-GalAp (1-4) \uparrow D-Trip \pm α -L-Fucp 又は \pm β -D-Galp)

* 乳化剤

* 増粘剤

(例えば、カラゲナン (族)、

* 歯周病疾患

(例えば、 $\text{HAW} \xrightarrow{\alpha 1-3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1-3} \text{GlcNAc}$)

* 下痢

(例えば、 $\text{GlcNAc} \xrightarrow{\beta 1-4} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1-3} \text{GlcNAc} \xrightarrow{\beta 1-3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1-4} \text{Isc}$ \uparrow $\alpha 1-2$ \uparrow Isc)

* 外科 (院内) 感染

* カテーテル関連性感染

3. 抗腫瘍剤

* 硬結性腫瘍転移

(例えば、 $\text{HAW} \xrightarrow{\alpha 1-3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1-3} \text{GlcNAc} \xrightarrow{\beta 1-3} \text{Gal}$ \uparrow $\alpha 1-4$ \uparrow Isc)

4. 抗炎症剤

* 肝中球・血小板相互作用

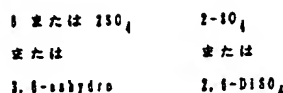
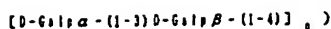
* WBC 内皮相互作用

5. 海上牽引感緩和剤

* 船体動揺感

6. 避妊薬

(例えば、 $\text{GlcNAc} \xrightarrow{\beta 1-3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1-4} (\text{GlcNAc} \xrightarrow{\beta 1-3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1-4})$ 1-6



10. 賦活用剤

* 抗菌剤

* 抗ウイルス剤

* 抗真菌剤

* 抗炎症剤

上記から、本発明は、本発明に従って調製されたサッカライド組成を含む、医薬組成物、食品組成物のようなその他の組成を与える。本発明によって与えられる医薬組成物・食品組成物のいずれにおいても、本発明のサッカライド組成は、 $10^{-3} \mu\text{g/ml}$ から 10^4 mg/ml の量として存在する。

何かある特定の医薬組成物または食品組成物におけるサッカライド組成の濃度は、使用するサッカライドの活性という点から見ると様々であろう。医薬組成物の場合、その組成の中のサッカライドの濃度は、何かの組成にたいして、インビトロで測

ライド組成を調製するための効率的方法がなかったために、サッカライド組成を、活性成分として含む市販組成を得ることはできなかった。

本発明は、そのようなサッカライド組成を、初めて、簡単に大量に入手することを可能にした。本発明の方法を用いれば、これまでほんの少量しか入手できなかったサッカライド組成が、また、これまで入手出来なかったサッカライド組成が、グラムないしキログラム量で簡単に生産できる。本発明によって与えられるサッカライド組成の純度は、15重量%を超える。ある種の、高純度を要求する応用では、本発明の方法を用いて、15重量%からほとんど 100重量%に近い純度のサッカライド組成を得ることも可能である。

したがって、本発明は、今や、サッカライド組成を有効量含む医薬組成物ならびに他の組成物を初めて供給することになる。本発明は、本発明に従って生産されるサッカライド組成を、少なくとも 100 mg、できれば少なくとも 500 mg の量として、かつ、それを、その組成の95重量%まで含む組成物を供給する。

もう一つの実施例として、本発明は、本発明に従って使用するのに適当な装置を与える。これは、グリコシルトランスフェ

特表平5-500905 (12)

定した活性に依存するであろう。食品組成物について えば、本発明のサッカライド組成の濃度は、添加する化合物の既知の活性に従って決めることができる。

例えば、母乳は、上記のように、幼児のためにも、尿路感染を防ぐ抗菌剤としても有効であるようなサッカライド組成を含んでいる。これを踏まえて、本発明は、市販の幼児用処方方に改良を加えたものである。すなわち、これら市販の幼児用処方方に、上記のサッカライド組成を添加することによってそれを實現した。上記の、特定のサッカライドを、市販の幼児用処方に、 $0.1 \mu\text{g/ml}$ から $1000 \mu\text{g/ml}$ の量加えてもよい。このサッカライドは、母乳には、およそ $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度で存在する。

医薬組成物には、発熱性物質があってはならない。本発明に一致する医薬組成物は、その分野に既知のやり方で調製し、経口、静注、筋注、直腸、経皮、経鼻孔（例えば、鼻粉等）投与に達するようにしてもよい。それはまた、クリーム、塗り薬、懸濁液等の形で、局所投与にふさわしいように調製してもよい。

二三のサッカライドは、従来、食品、繊維、石油化学における一般化学薬品としても、主に医学領域における特殊化学薬品としても、重要なものと注目されてきたが、これまで、サッカ

ラーゼ触媒による、サッカライド組成の合成に用いられるものである。そのような装置の模式形態を、第1、2、3図に示す。

ある、きわめて基本的な実施例をあげると、本発明の装置は、一つの反応室を持つ。この中で、全部のグリコシルトランスフェラーゼ、あらかじめ選んだサッカライド・ユニットと最初の受容体部分のすべてを結合させる。グリコシルトランスフェラーゼの特異性によって、この混合物は、十分な時間を与えれば、本発明のサッカライド組成を生産する。

第1、2、3図は、本発明にしたがって用いることのできる、効率的設計の装置を图示している。図に示した装置は、その基本要素として、入口、出口を備えた反応器を含む。この反応器は、複数の、あらかじめ選んだサッカライド・ユニットを、受容体部分上に、連続的に共有結合させていき、それを、その共有結合の各々に特異的な、複数の、相応のグリコシルトランスフェラーゼの触媒の下に行なう、そのような結合反応の實施に通している。これは、少なくとも3個の、望ましくは、4個の、さらに望ましくは、4個を超える数の、例えば、5、6、7個以上の、異なるグリコシルトランスフェラーゼを含み、かつ、これら酵素は望ましくは固定されている。

入口機構は、受容体部分と、複数の、あらかじめ選んだサッカライド・ユニットとを、反応器内に導入し、サッカライド組成が合成されるよう、ふさわしく出来ているものである。できれば、入口機構は、反応器内に、グリコシルトランスフェラーゼを導入するのにもふさわしくできている、かつ、グリコシルトランスフェラーゼ自体はできれば固定されていることが望ましい。出口機構は、サッカライド組成を、反応器から放出させるためのものである。

第1図は、固相支持体を負荷した、カラム型反応器を示す。本工程に使用される、異なるグリコシルトランスフェラーゼ（酵素1、2、3）を、その固相支持体全体にランダムに分布させても、または、第1図に示すように数層に配置してもよい。最初の受容体部分（図のA）と、あらかじめ選んだサッカライド・ユニット（図のB、C、D）とを、入口機構から、反応器内に負荷し、固相の支持体を通過させる。この支持体上で、サッカライド組成が、特異的グリコシルトランスフェラーゼの活動により生産され、出口機構から、分子A-1-(C-D)として回収される。

第2図に示した実施例では、最初の受容体部分と、その最初

の受容体部分に付着させるべき、あらかじめ選んだサッカライド・ユニットとを、固相支持体の頂上に負荷し、選択された各サッカライド・ユニットの添加に特異的なグリコシルトランスフェラーゼを、反応混合物の流れる方向にそって、対応する層に配置する。次に、あらかじめ選んだ、異なるサッカライドを、図に示すように、反応混合物の流れに沿って、対応的に通当する位置に、それぞれに添加する。

もう一つの好ましい実施例では、これは、第3図に示されているが、反応器は、直列に接続した、複数（n）の反応層から成る。この接続は、相互の、連続的流体連絡を可能にするように行なわれており、また、ここに、（n）は、付着させるサッカライド・ユニットの数より多くはない、そのような数にはば相当する。各反応層は、あらかじめ選んだ、特定のサッカライド・ユニットを、別段の反応層で形成された中間産物に結合させるのに特異的触媒として働く、少なくとも1個のグリコシルトランスフェラーゼを含んでいる。

本実施例に従えば、最初の受容体部分（A）と、その受容体部分に付着させるべき、あらかじめ選ばれた、最初のサッカライド・ユニット（B）を、最初の反応層を通過させるが、この

反応層は、あらかじめ選ばれた、最初のサッカライド・ユニットを、最初の受容体部分に結合させるのに特異的触媒として働くグリコシルトランスフェラーゼを含んでおり、これにより、最初の間産物が生産される。次に、この最初の間産物は、第2の反応層（n=1）に転送され、ここで、あらかじめ選ばれた第2のサッカライド・ユニット（X₂）、および、あらかじめ選ばれた第2のサッカライド・ユニットを、形成された第1の間産物に結合させるのに特異的触媒として働くグリコシルトランスフェラーゼ（E₁₊₁）とに、結合させられる。この工程を、A-B-...-(X)₂...Zと書かれている標的サッカライド組成が得られるまで、反応層の相当する数だけ繰り返す。ここに、各X部分は、独立に選択されるものとする。

もう一つの好ましい実施例では、これも、第3図に描かれているが、各中間産物4を精製する機構が、各反応層間の、流体連絡路に位置している。この中間産物は、ある任意の反応層から放出される反応混合物から形成されるものである。この精製機構は、反応混合物中の汚染物を除去するもので、この汚染物は、あらかじめ選ばれた、次段のサッカライド・ユニットを、形成された中間産物に結合させる効率を下げたものである。

本発明の、これ以外の、目的、長所、新しい特質は、下記の実施例を調べれば、この分野に熟練した人々にとっては明かであろう。ただし、この実施例は、限定的な意図を持つものではない。

実施例1. トリサッカライドN-アセチルニューラミニル α -1-3ガラクトシル β -1-4N-アセチルグルコサミンの調製

5本の試験管の各々に、pH 7.4の燐酸カルシウム・バッファー、10 μ l、50mM NaCl₁、10 μ l、シタジン1燐酸-[14C]-N-アセチルニューラミン酸、17,000CPM、ガラクトシル・トランスフェラーゼ、25 μ l、N-アセチルニューラミニル・トランスフェラーゼ、25 μ lを加えた。グリコシル・トランスフェラーゼは、牛初乳から、セファデックス G-100ゲル・クロマトグラフィーによって精製した。

試験管1に、さらに、1000のウリジン二燐酸ガラクトース、10 μ l、40mM N-アセチルグルコサミン、10 μ lを加えた。試験管1を、水中で、1時間インキュベートした。

試験管2にも、40mMのウリジン二燐酸ガラクトース、10 μ lを加えた。試験管2を37°Cで、1時間インキュベートした。

試験管3にも、40mMのN-アセチルラクトサミン、10 μ l

を加えた。試験管3を、37℃で1時間インキュベートした。

試験管4と5に、10mMのウリジン二磷酸ガラクトース、10μlと、10mMのN-アセチルグルコサミン、10μlを加えた。試験管4と5を、37℃で1時間インキュベートした。

インキュベーション後、試験管の内容を、各々、4ホウ酸ナトリウムで飽和させたペーパー上で、高圧の電気放電にかけた。等位的に転換したトリサッカライド産物は、その移動性によって特定した。これは、試験管3に形成された複製物で示される通りである。

試験管 トリサッカライド (cpm)

1	1
2	1
3	1375
4	874
5	111

これで分かるように、試験管4、5中に、適当な受容体部分、供与体部分、グリコシルトランスフェラーゼのあることが、モノサッカライド開始物質から、予想通りのトリサッカライド産

においては、トリサッカライドは、ジサッカライド受容体部分(N-アセチルグルコサミン)を、シチジン1-β-D-リボシル-N-アセチルニューラミン酸、および、N-アセチルニューラミニル・トランスフェラーゼに接触させて形成した。

試験管2にはトリサッカライドが存在しなかったが、これは、トリサッカライド形成には、適当な受容体部分が必要であることを示している。試験管1にはトリサッカライドが存在しなかったが、これは、トリサッカライドの合成は、実際に、何らかの酵素(グリコシル・トランスフェラーゼ)の活性に依存していることを示している。すなわち、この酵素が低温で不活性であったわけである。

オリゴサッカライド、N-アセチルガラクトサミニル α 1-1 (フコシル α 1-2)、ガラクトシル β 1-4N-アセチルグルコサミニル β 1-3ガラクトース(下痢発症性細菌にたいする標的)、および、N-アセチルガラクトサミニル β 1-4ガラクトシル β 1-4グルコース(肺炎発症性細菌にたいする標的)も、本発明の工程を用いて、同様に調製できると期待されている。

物を生成した。通常、シアル酸N-アセチルニューラミン酸は、これを、サッカライド組成に組み込もうとする有機合成化学者にとって、特殊な問題を形成することになる。これは、そのグリコシド結合が、酸にたいして脆弱であることから発生する。シチジン1-β-D-リボシル-N-アセチルニューラミン酸からトリサッカライドを酵素的に合成すれば、強い酸性条件下で、保護基を除去することに伴う合成上の問題を取り除くことができる。

受容体部分(N-アセチルグルコサミン)は、最初、供与体部分(ウリジン二磷酸ガラクトース)、グリコシル・トランスフェラーゼ(ガラクトシル・トランスフェラーゼ)と接触し、サッカライド組成(ガラクトシル β 1-4 N-アセチルグルコサミン)を形成し、これが、次に、第二の供与体部分(シチジン1-β-D-リボシル-N-アセチルニューラミン酸)と第二のグリコシル・トランスフェラーゼ(N-アセチルニューラミニル・トランスフェラーゼ)との接触時には、受容体部分として働くと考えられている。

試験管4・5においては、モノサッカライド開始物質から、トリサッカライド産物を合成したのであるが、このことは、試験管3の産物との比較から確かめられた。すなわち、試験管3

実施例2. テトラサッカライド合成プロトコル

酵素—N-アセチルグルコサミニル・トランスフェラーゼ

ヒト初乳を、10,000×Gで、1時間遠心する。25%飽和硫酸アンモニウム分画で上清を生じ、これを透析して、硫酸アンモニウムを除去する。残留物を、セファデックス G-200カラムに注ぐ。蛋白スペクトラムは、210 nmで、分光学的に測定し、放射能測定を行い、トランスフェラーゼ活性を持つ分画の位置を特定する。単一酵素ピークを含む分画をプールし、Bioassayにより10倍に濃縮する。プールした酵素標本を再び測定する。蛋白の濃度は、Bioassay法を用いて定量する。この標本の比活性は、1μg蛋白、1分当り 5.3 μCiである。

ガラクトシル・トランスフェラーゼ

ヒト初乳を、8,100×Gで、15分遠心する。上清を、チーズ布で濾し、10μlをセファデックス G-100カラム(2.5×90cm)に注ぐ。蛋白スペクトラムは、210nmで、分光学的に測定し、放射能測定を行い、酵素活性を持つ分画の位置を特定する。最高の活性を持つ分画をプールし、Bioassayにより10倍に濃縮する。プールされた酵素標本は、再び、測定し、その蛋白濃度を、上記のように定量する。標本の比活性は、1μg蛋白、

1分当り 15.1 pMol である。

酵素固定-N-アセチルグルコサミニル・トランスフェラーゼ

100mg の *Impergit* ビーズ (1.5ml) を、脱イオン水で、3回洗浄し、次に、消毒 *Bespi* バッファー水で、3回、洗浄する。酵素標本の 1ml を、UDP、ラクトース、 NaCl_2 (最終濃度はそれぞれ、10, 25, 10mM)、一滴のクロロフォルムとと共に、*Bespi* バッファー溶液中で、ビーズと結合させる。ビーズを、4℃で、2 1/2 日静かに攪拌する。分液を採取し、定期的に測定する。誘導化を防ぐために、ビーズを、無菌のバッファーで3回洗浄し、UDP、ラクトース、 NaCl_2 、クロロフォルムを含むバッファー中に、冷却保存する。

ガラクトシル・トランスフェラーゼ

1.15g のビーズを、脱イオン水で、3回洗浄し、次に、無菌の、*Bespi* 緩衝水で、3回洗浄する。このビーズを、各 1ml の酵素標本液に (いずれの場合も、至適誘導条件は、250 mg のビーズにたいして蛋白質 1mg の時に起こる)、UDP、 GlcNAc 、 NaCl_2 (最終濃度はすべて 10mM) や、一滴のクロロフォルムと一緒に、*Bespi* 緩衝液中で与えた。誘導化と保存は、上記の通りである。ただし、 GlcNAc は、ラクトースでなく、ガラクト

シル・トランスフェラーゼと共に用いる。これは、N-アセチルグルコサミニル・トランスフェラーゼにたいする受容体である。

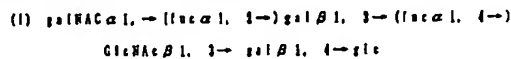
テトラサッカライド生産

誘導化されたN-アセチルグルコサミニル・トランスフェラーゼ (0.5ml ビーズ) を、ラクトース (25mM)、UDP GlcNAc (20μM)、 NaCl_2 (10mM) と共に、2 1/2 時間、絶えず攪拌しながら、インキュベートする。このインキュベーションを2重に行なう。片方のインキュベーションによる上清は、トリサッカライド (14μg) の生成量を測定するのに用いられ、もう一方のインキュベーションによる上清は、ガラクトシル・トランスフェラーゼによって誘導された 0.5ml ビーズに加えられる。したがって、このガラクトシル・トランスフェラーゼ・インキュベーション物は、14μg のトリサッカライド、25μg の UDP gal 、10mM の NaCl_2 を含む。室温で2 1/2 時間置くと、第二の酵素標本は、約 1.6μg のテトラサッカライドを生成した。3 1/2 時間後では、2.3 μg のテトラサッカライドが生産された。

実施例3

下記の処方は、3種の、比較的複雑なオリゴサッカライドを

合成するのに用いることができる。すなわち、A、B型ミルク・オリゴサッカライド (1, 11) とトラガカント・ゴムであって、後者は、食品添加物として、トン単位で使用者される植物性オリゴサッカライドである。



最初に、CBB7活性支持体、例えば、セファロースに付着させるグルコースの、ヘキサノラミン・グリコシド ($\text{glc}-0-(\text{C}_6\text{H}_4)_2$ (1- H_2N)) を、ヘキサノラミンのアミノ基を介して合成する。次に、グルコース認識性のガラクトシル・トランスフェラーゼを、このアフィニティー・リガンドを用いて、ヒトのミルクないし初乳から精製する。この酵素は、一部でも精製すれば、グルコースをガラクトース化するのに使用することができ、ラクトースを生成する。

別のやり方としては、ラクトースのヘキサノラミン・グリコシドを合成する。これは、安価で、簡単に手にはいるジサッカライドである。このようにして生成されたラクトースを、セファロースに付着させ、アフィニティー・リガンドとして用いる。次に、これを用いて、ヒト初乳、ないし、ヒト血漿由来の、N

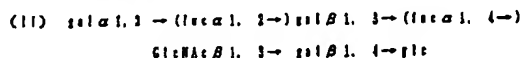
-アセチルグルコサミニル・トランスフェラーゼを一部精製する。

次に、この第2のトランスフェラーゼを用いて、N-アセチルグルコサミンをラクトースに加え、トリサッカライドを生成し、これを、再び、セファロースに付着させる。この、結合したトリサッカライドを用いて、 β 1, 3 ガラクトシル・トランスフェラーゼ (ブタ顎下腺由来) を得、これが、次に、次級の酵素— α 1, 4 フコシル・トランスフェラーゼ (ブタ肝臓由来) を生成する基質を生産する。 α 1, 2 フコシル・トランスフェラーゼ (ブタ顎下腺由来)、および、最後に、A型ミルク・オリゴサッカライドの合成を停止させる。 α 1, 1 N-アセチルガラクトサミニル・トランスフェラーゼ (ブタ顎下腺由来) を、この段階法により、アフィニティー・クロマトによって生成する。このようにして得られた各トランスフェラーゼは、いくつかの手段の内のいずれかを用いて、固相基質に固定し、この基質を、カラム型に注ぐ。

酵素含有カラムを順々に、誘導される基質の合成が次第に小量になっていく順序に使用し、各溶解性オリゴサッカライドを大量に合成する。これよりさらに単純な別法として、各酵素を

順番に用いて、その底物の少量を合成し、次に、これを、ヘキサノラミン・リンカーを用いて、セファロースに固定するやり方がある。この別法では、ヘキサノラミン・リンカーを、6種の化合物に付させ、誘導化を、6種のヘキサノラミン含有グリコシドによって行なうことが必要となろう。この方法では、ただ、ヘキサノラミン1段階と、グルコース・ヘキサノラミンからセファロースへの1誘導化しか必要でなく、しかも、後者は、比較的込み入ったところのない過程である。

糖付着の順番は重要である。近位フコース ($\alpha 1,4$ を $\beta 1,4$ に付着させる) は、第2のフコース ($\alpha 1,2$ をガラクトースに付着させる) の添加の前に、反応を完了した、中鎖テトラサッカライドに付着させなければならない。最後に、末端 $\beta 1,4$ ($\alpha 1,3$) を加えて、7糖オリゴサッカライドを完了する。この順番は、グリコシル・トランスフェラーゼの特異性から要求されるものである。



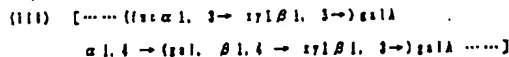
Iを合成したならば、IIも厳密に同様にして合成する。ただし、ヘキササッカライドを用いる。これは、第一に、N-ア

コシル化、ガラクトシル化する。このオリゴサッカライドの場合、キシロシル化、フコシル化、ガラクトシル化の度合は、経験的に、これら化合物が、対応する酵素含有カラムを通過するその回数でコントロールされる。生成される繰り返シユニットの数は、最初に用いられるガラクトツロン酸の数に依存シ、この数は、長さにして、4から20モノサッカライド・ユニットの間に渡る。

* * * * *

上記の開示事項に照らして、本発明については、多数の修飾、変更が可能であることは明かである。従って、付属の請求項の範囲内においても、本発明は、ここに特に記載したものとは別のやり方で実行することもできるということは了解される筈である。

セチルガラクトシル・トランスフェラーゼではなく、ガラクトシル・トランスフェラーゼにたいする保護基を持って誘導される α 1,3ガラクトシル・トランスフェラーゼを精製するのに用いられる。つぎに、この酵素を用いて、B型オリゴサッカライドを合成する。



トラガcant・ゴムの $\alpha, 1, 4$ ガラクトツロン酸幹鎖、これは、最近では、わずかに、中東に土着するある樹種の皮から入手することができるものであるが、これを合成する酵素を単離するには、ヘキサガラクトツロナンスを、柑橘類果皮の一般的な成分であるペクチンから調製し、これを、アフィニティー・クロマトのリガンドとして用いる。

同じアフィニティー・リガンドを、樹種に用いて、次には、近位 β 1,3キシロシドを合成するキシロシル・トランスフェラーゼを単離することができる。キシロシル化したガラクトツロナンは、一旦切離されると、フコシル・トランスフェラーゼ、ガラクトシル・トランスフェラーゼの単離に用いることができる。後者はそれぞれ、キシロシル化したガラクトツロナンを、フ

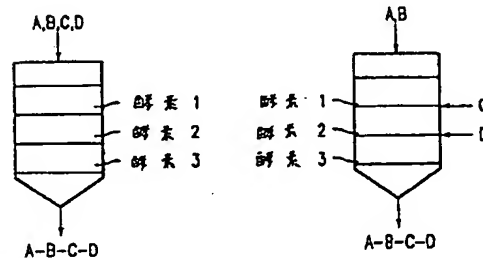


FIG. 1

FIG. 2

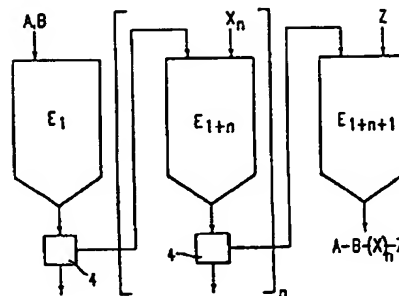


FIG. 3

要 約

サッカライド組成の調製法を開示した。この方法は、反復的
で、下記の 3 段階から成る。

(1) あらかじめ選んだサッカライド・ユニットを受容体部分に移送することのできるグリコシルトランスフェラーゼを単離するが、この単離は、この受容体部分を、このグリコシルトランスフェラーゼを含むと予測される混合物と、この受容体部分とこのグリコシルトランスフェラーゼとの結合を實現させる条件下で、接触させて行い、これによって、グリコシルトランスフェラーゼを単離する。受容体部分は、蛋白、糖蛋白、脂質、糖脂質、ないし、炭水化物である。

(iii) 次に、単純されたグリコシルトランスフェラーゼを用いて、受容体部分と、あらかじめ選んだサッカライド・ユニットとの間の結合を触媒する。

(111) 段階(1)と(11)を複数回繰り返す。この時、この方法の第1回工程で得られた中間産物を、第2回工程の受容体部分として用いる。

[illegible]

N. DOCUMENTS CORRESPONDING TO ALTERNATE (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category	Category of Document, and research, report, abstract, or the technical publication	Reference to Class No.
Y	US.A. 4,563,445 (Feizi et al.) 07 January 1986, see entire document..	16-18
Y	WO.A. 89/09378 (Nilsson) 08 October 1989, see entire document.	16-31
AY	US.A. 4,261,976 (Isselbacher et al.) 14 April 1981, see entire document.	29-30
Y	Chemical Abstracts, Volume 98, Number 15, issued 13 April 1981, Isaac et al., "Isolation and Characterization of a major glycoprotein from milk-fat-globule membrane of human breast milk", see page 239, columns 1 and 2, Abstract no. 116212p. Biochemistry Journal, 193(1), 47-54.	33
Y	Chemical Abstracts, Volume 91, Number 13, issued 24 September 1979, Chatterjee et al., "Glycosyltransferase and glycosidase activities in ovarian cancer," see page 446, column 1, Abstract no. 106300a. Cancer Res., 36(6,PT.1), 1943-51.	30
Y	Chemical Abstracts, Volume 109, Number 17, issued 24 October 1988, Krivan et al., "Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc β 1-4 Gal found in some glycolipids", see page 421, column 1, Abstract No. 1462178, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85(16), pages 6157-6.	28
P.Y	Chemical Abstracts, Volume 114, Number 9, issued 04 March 1991, On Stefano et al., "Analysis of Pseudomonas carolin- ensis well. II Sugar composition," see pages 389 and 390, columns 2 and 1, abstract no. 78313v, J. Protozool., 37(5), 436-41.	28
P.Y	US.A. 4,925,706 (Baruh et al.) 15 May 1990, see entire document.	1-31

[illegible]

PCT/U891/02430

Attachment to form PCT/ISA/210
Continuation in part VI.
Observations Where Unity of
Invention is Lacking

- I. Claims 1-27 and 34-38 drawn to a process of making, a product and an apparatus classifiable in Class 433, subclass 37.
- II. Claim 28, drawn to a composition classifiable in Class 514, subclass 61.
- III. Claim 29, drawn to a composition classifiable in Class 424, subclass 54.
- IV. Claim 30, drawn to a composition classifiable in Class 514, subclass 388.
- V. Claim 31, drawn to a composition classifiable in Class 514, subclass 23.
- VI. Claim 32, drawn to a food composition classifiable in Class 424, subclass 531.
- VII. Claim 33, drawn to a food composition classifiable in Class 424, subclass 531.

The claims of these seven groups are directed to different inventions which are not linked as to form a single general inventive concept.

第1頁の続き

⑤Int. Cl. *

A 61 K 31/70

C 07 H 37/20
3/06
7/027

識別記号

ACD
ACK

庁内整理番号

8314-4C
8314-4C
7822-4C
7822-4C

平成 6.11.18 発行

手続補正書

送

平成6年3月22日

特許法第17条第1項又は第17条の2の規定による補正の掲載

平成 3年特許願第507770号(特表平 5-500905号、平成 5年 2月25日発行公表特許公報)については特許法第17条第1項又は第17条の2の規定による補正があったので下記のとおり掲載する。

Int.Cl. ⁸	識別 記号	庁内整理番号
C12P 19/18		7432-4B
A61K 7/22		7252-4C
31/70	ABE	
	ACD	
	ACK	8314-4C
37/20		8314-4C
C07H 3/06		7822-4C
7/027		7822-4C

特許庁長官 藤 生 良 殿

1. 事件の表示 平成3年特許願第507770号
2. 発明の名称 サッカライド組成、その合成法と合成装置

3. 補正をする者
事件との関係 特許出願人

名 称 ザ・トラステイズ・オブ・
ザ・ユニバーシティー・
オブ・ペンシルバニア

4. 代 理 人 東京都新宿区新宿 1丁目1番14号 山田ビル
(郵便番号 110) 電話 (03) 3354-1123
(1110) 弁護士 川 口 義 雄
(ほか4名)

5. 補正命令の日付 自 発

6. 補正により増加する請求項の数 63

7. 補正の対象 請求の範囲

8. 補正の内容 請求の範囲を別紙の通り補正する。

方式
審査



[別 紙]

請 求 の 範 囲

1. あらかじめ選んだサッカライド・ユニットを、受容体部分に選択的に結合させることによる、グリコシルトランスフェラーゼ触媒による、サッカライド組成の調製法であって、次の諸段階から成る方法:

(1) あらかじめ選んだサッカライド・ユニットを受容体部分に移送することである、グリコシルトランスフェラーゼを、受容体部分と、複数のグリコシルトランスフェラーゼを含むと予想される混合物とを、上記受容体部分と上記グリコシルトランスフェラーゼの結合を促進させるような条件下で接触させ、分離することによって得、ここに、上記受容体部分は、蛋白質、糖蛋白質、脂質、炭水化物類から選ばれた一つであり;

(11) 上記あらかじめ選んだサッカライド・ユニットを、上記グリコシルトランスフェラーゼ触媒の下で、上記受容体部分に結合させるのに十分な条件と共存試薬を供給し、これにより、

ある産物を得;

(111) 段階(1)、(11)を少なくとも一回繰り返して、それによって、任意の繰り返し工程における段階(11)で得られた産物を、次回工程の段階(1)の受容体部分として使用し、これを、上記サッカライド組成が得られるまで繰り返す。

2. 請求項1の方法であって、上記炭水化物が、モノサッカライド類、リサッカライド類、オリゴサッカライド類、及びポリサッカライド類から成るグループから選ばれた一つである方法。

3. 請求項1の方法であって、段階(11)で用いられるグリコシルトランスフェラーゼが、固相支持体に固定されている方法。

4. 請求項2の方法であって、固相支持体に付着された上記グリコシルトランスフェラーゼが、固定操作の間、上記グリコシルトランスフェラーゼの活性部位を保護することによって得られたものである方法。

5. 請求項1の方法であって、上記共存試薬が、マンガン陽イオンを含む方法。

6. 請求項1の方法であって、段階(11)で使用する上

記サッカライドがサッカライド・ヌクレオチドである方法。

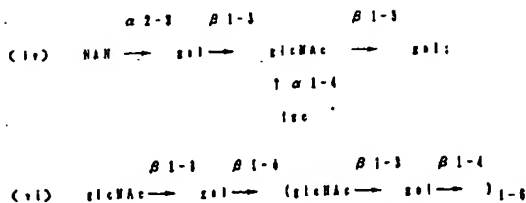
7. 請求項5の方法であって、上記ヌクレオチドが、ウリジン、グアノシン及びシチジン誘導体から成るグループから選ばれた一つである方法。

8. 請求項1の方法であって、上記第一回工程で使用する上記受容体部分が、蛋白質類、糖蛋白質類、脂質類及び糖脂質類から成るグループから選ばれた一つである方法。

9. 請求項1の方法であって、上記第一回工程で使用する上記受容体部分が、モノサッカライド類、ジサッカライド類、オリゴサッカライド類及びポリサッカライド類から成るグループから選ばれた一つである方法。

10. 請求項1の方法であって、上記第一回工程で使用する上記受容体部分が、N-アセチルグルコサミンである方法。

11. 請求項1の方法であって、上記第一回工程で使用する上記受容体部分がN-アセチルグルコサミンであり、上記第一回工程で使用する上記グリコシルトランスフェラーゼがガラクトシル・トランスフェラーゼであり、上記第二回工程で使用する上記グリコシルトランスフェラーゼがN-アセチルノイラミニル・トランスフェラーゼである方法。



16. 医薬組成物であって、薬学的に受容できる既形質または搬送剤と共に、ヘパリン以外の實質的に生物学的に特異なサッカライド組成を薬学的に有効量含む、該サッカライド組成は、あらかじめ選ばれたサッカライド・ユニットを、受容体部分へ、グリコシルトランスフェラーゼ触媒の下、連続的に結合させる方法によって調製されるもので、その方法は、下記の諸段階から成る：

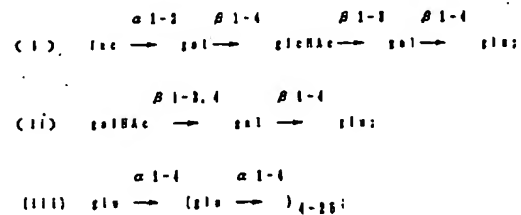
(1) あらかじめ選んだサッカライド・ユニットを受容体部分に移送することのできる、グリコシルトランスフェラーゼを、受容体部分と、グリコシルトランスフェラーゼを含むと予想される混合物とを、上記受容体部分と上記グリコシルトランスフェラーゼの結合を實現させるような条件下で接触させ、準備することによって得、ここに、上記受容体部分は、蛋白質類、糖蛋白質類、脂質類、糖脂質類、炭水化物類から選ばれた一つであり；

12. 請求項1の方法であって、上記第二回工程で使用する上記受容体部分が、ガラクトシル β 1-4 N-アセチルグルコサミンである方法。

13. 請求項1の方法であって、使用される供与体部分の少なくとも1つが、シチジン1誘導N-アセチルノイラミン酸である方法。

14. 請求項1の方法であって、複数のグリコシルトランスフェラーゼを含むと予想される上記混合物が、細胞ホモジェネートである方法。

15. 請求項1の方法であって、上記サッカライド組成が、下記の式の一つで表わされる化合物である方法：



白頭、脂質類、糖脂質類、炭水化物類から選ばれた一つであり；
(11) 上記あらかじめ選んだサッカライド・ユニットを、上記グリコシルトランスフェラーゼ触媒の下で、上記受容体部分に結合させるのに十分な条件と共存試薬を供給し、これにより、ある産物を得；

(111) 段階(1)、(11)を少なくとも一回繰り返して、それによって、任意の繰り返し工程における段階(11)で得られた産物を、次回工程の段階(1)の受容体部分として使用する。

17. 請求項16の医薬組成物であって、少なくとも 10mg の上記サッカライド組成を含む組成物。

18. 請求項16の医薬組成物であって、少なくとも 1g の上記サッカライド組成を含む組成物。

19. 請求項16の医薬組成物であって、上記第一回工程で使用する上記受容体部分が蛋白質である組成物。

20. 請求項16の医薬組成物であって、上記第一回工程で使用する上記受容体部分が糖蛋白質である組成物。

21. 請求項16の医薬組成物であって、上記第一回工程で使用する上記受容体部分が脂質である組成物。

- 749 - 3 -

二つである前記装置。

35. 請求項34の装置であって、上記反応器が、相互に連続的に流体連絡を形成するように、連続的に接続された複数の反応層から成り、ここに、各反応層は、あらかじめ選んだサッカライド・ユニットを、前段反応層で形成された中間産物に結合させるのに特異的な触媒として働くグリコシルトランスフェラーゼを含む装置。

36. 請求項34の装置であって、上記反応層の各々において形成された中間産物を、そこで生成された他の反応混合物より精製する手段が、流体連絡内で、上記反応層それぞれの間にある装置。

37. 請求項34の装置であって、上記グリコシルトランスフェラーゼが固相支持体上に固定されている装置。

38. 請求項37の装置であって、上記固相支持体の上に固定された上記グリコシルトランスフェラーゼの活性部位が、固定操作の間保護されている装置。

39. 少なくとも一つのあらかじめ選んだサッカライド・ユニットを、中間産物に連続的に結合させることによる、グリコシルトランスフェラーゼ触媒による、サッカライド組成の調製

40. 請求項39の中間産物であって、上記炭水化物類がモノサッカライド類、ジサッカライド類、オリゴサッカライド類及びポリサッカライド類から成るグループから選ばれた一つである中間産物。

41. 請求項39の中間産物であって、上記第一回工程で使われる上記受容体部分が、蛋白質類、糖蛋白質類、脂質類及び糖脂質類から成るグループから選ばれた一つである中間産物。

42. 請求項39の中間産物であって、上記第一回工程で使われる上記受容体部分が、モノサッカライド類、ジサッカライド類、オリゴサッカライド類及びポリサッカライド類から成るグループから選ばれた一つである中間産物。

43. 請求項39の中間産物であって、上記第一回工程で使われる上記受容体部分が、N-アセチルグルコサミンである中間産物。

44. 請求項39の中間産物であって、上記第一回工程で使われる上記受容体部分がN-アセチルグルコサミンであり、上記第一回工程で使われる上記グリコシルトランスフェラーゼがガラクトシル・トランスフェラーゼであり、上記第二回工程で使われる上記グリコシルトランスフェラーゼがN-アセ

チルに基いた少なくとも100mgの實質的に生物学的に純粋な中間産物であって、次の階段階から成る方法で得られた前記中間産物：

(1) あらかじめ選んだサッカライド・ユニットを受容体部分に移送することのできる、グリコシルトランスフェラーゼを、受容体部分と、複数のグリコシルトランスフェラーゼを含むと予想される少なくとも一つの混合物とを、上記受容体部分と上記グリコシルトランスフェラーゼの結合を促進させるような条件下で接触させ、単離することによって得、ここに、上記受容体部分は、蛋白質類、糖蛋白質類、脂質類、糖脂質類、炭水化物類から選ばれた一つであり；

(11) 上記あらかじめ選んだサッカライド・ユニットを、上記グリコシルトランスフェラーゼ触媒の下で、上記受容体部分に結合させるのに十分な条件と共存試薬を供給し、これにより、ある産物を得；

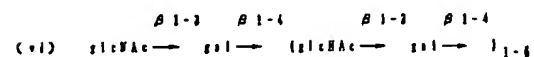
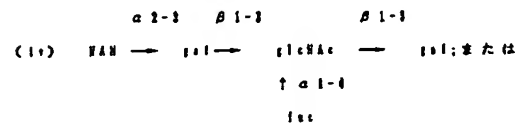
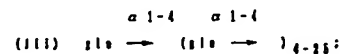
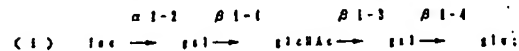
(111) 段階(1)、(11)を少なくとも一回繰り返して、それによって、任意の繰り返し工程における段階(11)で得られた産物を、次回工程の段階(1)の受容体部分として使用し、これを、上記中間産物が得られるまで繰り返す。

チルノイラミニル・トランスフェラーゼである中間産物。

45. 請求項39の中間産物であって、上記第二回工程で使われる上記受容体部分が、ガラクトシル β 1-4 N-アセチルグルコサミンである中間産物。

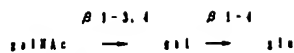
46. 請求項39の中間産物であって、使用される供与体部分の少なくとも一つが、シチリン1磷酸N-アセチルノイラミン酸である中間産物。

47. 請求項39の中間産物であって、上記サッカライド組成が、下記の式の一つで表わされる化合物である中間産物：



平成 6.11.18 発行

48. 下記の式の化合物:



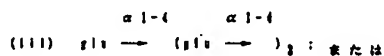
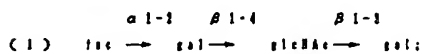
49. 請求項1の方法であって、前記段階(i)、(ii)を段階(iii)において複数回実施する方法。

50. 請求項39の中間産物であって、前記段階(i)、(ii)を段階(iii)において複数回実施する中間産物。

51. 請求項16の方法であって、前記段階(i)、(ii)を段階(iii)において複数回実施する方法。

52. 請求項32の方法であって、前記段階(i)、(ii)を段階(iii)において複数回実施する方法。

53. 請求項39の中間産物であって、以下の式の一つを持った中間産物:



合させるのに十分な条件と共存試薬を供給し、これにより、ある産物を得;

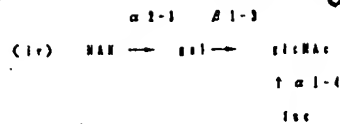
(iii) 段階(i)、(ii)を少なくとも一回繰り返して、それによって、任意の繰り返し工程における段階(ii)で得られた産物を、次回工程の段階(i)の受容体部分として使用し、これを、上記中間産物が得られるまで繰り返す。

55. 請求項54の方法であって、上記炭水化物が、モノサッカライド類、ジサッカライド類、オリゴサッカライド類、及びポリサッカライド類から成るグループから選ばれた一つである方法。

56. 請求項54の方法であって、上記第一回工程で用いられる上記受容体部分が、蛋白質類、糖蛋白質類、脂質類及び糖脂質類から成るグループから選ばれた一つである方法。

57. 請求項54の方法であって、上記第一回工程で用いられる上記受容体部分が、モノサッカライド類、ジサッカライド類、オリゴサッカライド類及びポリサッカライド類から成るグループから選ばれた一つである方法。

58. 請求項54の方法であって、上記第一回工程で用いられる上記受容体部分が、N-アセチルグルコサミンである方法。



54. 少なくとも一つのあらかじめ選んだサッカライド・ユニットを、中間産物に連続的に結合させることによる、グリコシルトランスフェラーゼ触媒による、サッカライド組成の調整に適した実質的に純粋な中間産物の製造方法であって、次の段階から成る方法:

(i) あらかじめ選んだサッカライド・ユニットを受容体部分に移送することのできる、グリコシルトランスフェラーゼを、受容体部分と、複数のグリコシルトランスフェラーゼを含むと予想される少なくとも一つの混合物とを、上記受容体部分と上記グリコシルトランスフェラーゼの結合を促進させるような条件下で接触させ、単離することによって得、ここに、上記受容体部分は、蛋白質類、糖蛋白質類、脂質類、糖脂質類、炭水化物類から選ばれた一つであり;

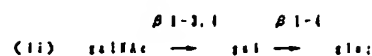
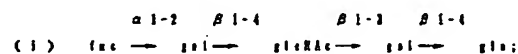
(ii) あらかじめ選んだサッカライド・ユニットを、上記グリコシルトランスフェラーゼ触媒の下で、上記受容体部分に結

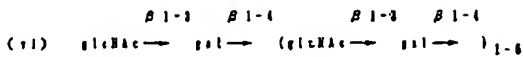
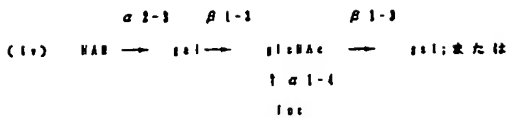
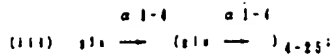
59. 請求項54の方法であって、上記第一回工程で用いられる上記受容体部分がN-アセチルグルコサミンであり、上記第一回工程で用いられる上記グリコシルトランスフェラーゼがガラクトシル・トランスフェラーゼであり、上記第二回工程で用いられる上記グリコシルトランスフェラーゼがN-アセチルノイラミニル・トランスフェラーゼである方法。

60. 請求項54の方法であって、上記第二回工程で用いられる上記受容体部分が、ガラクトシル $\beta 1-4$ N-アセチルグルコサミンである方法。

61. 請求項54の方法であって、用いられる供与体部分の少なくとも一つが、シチリン1磷酸N-アセチルノイラミン酸である方法。

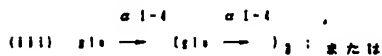
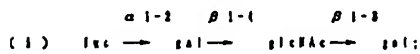
62. 請求項54の方法であって、上記サッカライド組成が、下記の式の一つで表わされる化合物である方法:





63. 請求項54の方法であって、前記段階(1)、(11)を段階(111)において複数回実施する方法。

64. 請求項54の方法であって、前記中間産物が以下の式の一つを持った方法：



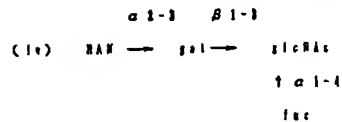
合させるのに十分な条件と共存試薬を供給し、これにより、ある産物を得；

(111) 段階(1)、(11)を少なくとも一回繰り返して、それによって、任意の繰り返し工程における段階(11)で得られた産物を、次回工程の段階(1)の受容体部分として使用し、これを、上記中間産物が得られるまで繰り返す方法によって得られた中間産物の使用方法であって、前記中間産物をサッカライド組成のグリコシルトランスフェラーゼ触媒による製造に使用することからなる方法。

66. 請求項65の方法であって、上記炭水化物が、モノサッカライド類、ジサッカライド類、オリゴサッカライド類、及びポリサッカライド類から成るグループから選ばれた一つである方法。

67. 請求項65の方法であって、上記第一回工程で使用する上記受容体部分が、蛋白質類、糖蛋白質類、脂質類及び糖脂質類から成るグループから選ばれた一つである方法。

68. 請求項65の方法であって、上記第一回工程で使用する上記受容体部分が、モノサッカライド類、ジサッカライド類、オリゴサッカライド類及びポリサッカライド類から成るグ



65. 少なくとも一つのあらかじめ選んだサッカライド・ユニットを、中間産物に連続的に結合させることによる、グリコシルトランスフェラーゼ触媒による、サッカライド組成の調製に適した実質的に純粋な中間産物であって、次の段階から成る方法：

(1) あらかじめ選んだサッカライド・ユニットを受容体部分に移送することのできる、グリコシルトランスフェラーゼを、受容体部分と、複数のグリコシルトランスフェラーゼを含むと予想される少なくとも一つの混合物とを、上記受容体部分と上記グリコシルトランスフェラーゼの結合を実現させるような条件下で接触させ、単離することによって得、ここに、上記受容体部分は、蛋白質類、糖蛋白質類、脂質類、糖脂質類、炭水化物類から選ばれた一つであり；

(11) あらかじめ選んだサッカライド・ユニットを、上記グリコシルトランスフェラーゼ触媒の下で、上記受容体部分に結

ループから選ばれた一つである方法。

69. 請求項65の方法であって、上記第一回工程で使用する上記受容体部分が、N-アセチルグルコサミンである方法。

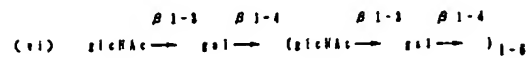
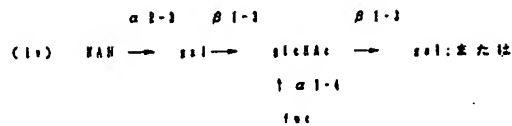
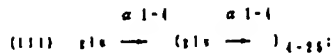
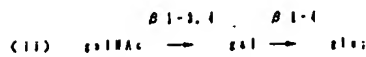
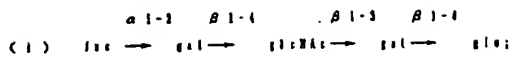
70. 請求項65の方法であって、上記第一回工程で使用する上記受容体部分がN-アセチルグルコサミンであり、上記第一回工程で使用する上記グリコシルトランスフェラーゼがガラクトシル・トランスフェラーゼであり、上記第二回工程で使用する上記グリコシルトランスフェラーゼがN-アセチルノイラミニル・トランスフェラーゼである方法。

71. 請求項65の方法であって、上記第二回工程で使用する上記受容体部分が、ガラクトシル $\beta 1-4$ N-アセチルグルコサミンである方法。

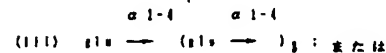
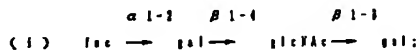
72. 請求項65の方法であって、使用される供与体部分の少なくとも一つが、シチジン1-磷酸N-アセチルノイラミン酸である方法。

73. 請求項65の方法であって、上記サッカライド組成が、下記の式の一つで表わされる化合物である方法：

平成 6.11.18 発行



74. 請求項 65 の方法であって、前記中間産物が以下の式の一つを持った方法:



ライド組成の、グリコシルトランスフェラーゼ触媒による合成のための装置であって、

反応器;

上記反応器中の上記サッカライド組成の合成に特異的な少なくとも三つの異なるグリコシルトランスフェラーゼ;

受容体部分と、復元の必要とするサッカライド・ユニットを、上記サッカライド組成が合成されるように上記反応器に導入するための入口機構;

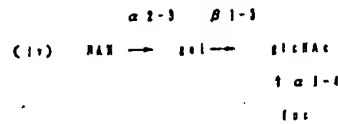
上記サッカライド組成を上記反応器から放出するための出口機構;

から成り、ここに、上記受容体部分は、蛋白質類、糖蛋白質類、脂質類、糖脂質類、炭水化物類から成るグループから選ばれた一つである前記装置。

83. 式: $\text{Gal} \rightarrow \text{GlcNAc} \rightarrow \text{Gal} - \beta - 1, 4 - \text{Glc}$ から成るテトラサッカライド組成の、グリコシルトランスフェラーゼ触媒による合成のための装置であって、

反応器;

上記反応器中での上記テトラサッカライド組成の合成に連した N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ及びガラク



75. サッカライド組成の生体外グリコシルトランスフェラーゼ触媒による合成法であって、前記合成において少なくとも四つの異なるグリコシルトランスフェラーゼを使用する方法。

76. 請求項 75 の方法であって、オリゴサッカライドが合成される方法。

77. 請求項 75 の方法であって、ポリサッカライドが合成される方法。

78. 請求項 75 の方法であって、糖蛋白が合成される方法。

79. 請求項 75 の方法であって、糖脂質が合成される方法。

80. 請求項 75 の方法であって、前記グリコシルトランスフェラーゼが固体支持体に固定されている方法。

81. 請求項 80 の方法であって、固体支持体に固定されているグリコシルトランスフェラーゼは、各グリコシルトランスフェラーゼの活性部位を、固定操作の間保護して得られる方法。

82. サッカライド・ユニット及び受容体部分からのサッカ

シルトランスフェラーゼ;

ラクトース、UDPGlcNAc 及び UDPgal を $\text{Gal} \rightarrow \text{GlcNAc} \rightarrow \text{Gal} - \beta - 1, 4 - \text{Glc}$ のテトラサッカライド組成が合成される上記反応器に導くための入口機構;

上記テトラサッカライド組成を上記反応器から放出するための出口機構;

から成る装置。

84. 請求項 34 の装置であって、上記受容体部分が蛋白である装置。

85. 請求項 34 の装置であって、上記受容体部分が糖蛋白である装置。

86. 請求項 34 の装置であって、上記受容体部分が脂質である装置。

87. 請求項 34 の装置であって、上記受容体部分が糖脂質である装置。

88. 請求項 34 の装置であって、上記受容体部分が炭水化物である装置。

89. 請求項 88 の装置であって、上記炭水化物がモノサッカライドである装置。

平成 6.11.18 発行

90. 請求項88の装置であって、上記炭水化物がジサッカライドである装置。
91. 請求項88の装置であって、上記炭水化物がオリゴサッカライドである装置。
92. 請求項88の装置であって、上記炭水化物がポリサッカライドである装置。
93. 請求項82の装置であって、上記受容体部分が蛋白質である装置。
94. 請求項82の装置であって、上記受容体部分が糖蛋白質である装置。
95. 請求項82の装置であって、上記受容体部分が脂質である装置。
96. 請求項82の装置であって、上記受容体部分が糖脂質である装置。
97. 請求項82の装置であって、上記受容体部分が炭水化物である装置。
98. 請求項97の装置であって、上記炭水化物がモノサッカライドである装置。
99. 請求項97の装置であって、上記炭水化物がジサッカ

ライドである装置。

100. 請求項97の装置であって、上記炭水化物がオリゴサッカライドである装置。

101. 請求項97の装置であって、上記炭水化物がポリサッカライドである装置。